

大鼠矽肺纤维化进程中肺巨噬细胞 *IL-1β*、*IL-17*、*CTGF* mRNA 表达的研究

周倩^{1,2}, 张兆强², 林立^{1,2}

1. 潍坊医学院公共卫生与管理学院, 山东 潍坊 261053
2. 济宁医学院职业卫生与环境医学重点实验室, 山东 济宁 272067

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.19525

摘要:

[背景] 矽肺是由于长期吸入游离二氧化硅 (SiO_2) 含量较高的生产性粉尘而引起的以肺组织弥漫性纤维化为主的全身性疾病。该病是目前我国发病率及患病率最高的职业性疾病, 但其发病机制尚未阐明。近年来, 有关巨噬细胞合成和分泌的细胞因子在矽肺纤维化进程中的作用受到关注。探讨肺巨噬细胞相关细胞因子的作用, 可能是揭示矽肺纤维化机制的重要方面。

[目的] 研究矽肺纤维化进程中大鼠肺巨噬细胞白细胞介素 1β (*IL-1β*)、白细胞介素 17 (*IL-17*)、结缔组织生长因子 (*CTGF*) mRNA 的表达及其改变。

[方法] 将 60 只 Wistar 大鼠随机分为 1 个对照组和 5 个染尘组 (15、30、60、90、120 d 染尘组), 每组 10 只。各染尘组大鼠经乙醚麻醉后, 一次性肺内注射 1 mL 矽尘悬浊液 ($100\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 分别进行为期 15、30、60、90、120 d 的染尘实验。对照组大鼠经乙醚麻醉后灌注等体积生理盐水。染尘实验结束后, 通过肺泡灌洗的方式获取肺巨噬细胞。取肺组织进行 HE 和 Masson 染色, 同时测定各组肺组织羟脯氨酸 (HYP) 含量和肺巨噬细胞 *IL-1β*、*IL-17*、*CTGF* mRNA 的表达量。

[结果] 染色结果显示: 15 d 染尘组大鼠肺泡结构略有破坏、胶原纤维略有增多; 随着染尘时间的延长, 肺组织纤维化逐渐明显; 120 d 染尘组大鼠整个肺组织呈弥漫纤维化改变。各组大鼠肺组织 HYP 含量随着染尘时间延长而增加, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且呈线性上升趋势 ($P < 0.05$)。对照组和 15、30、60、90、120 d 染尘组大鼠肺巨噬细胞 *IL-1β* mRNA 相对表达量分别为 1.00 ± 0.44 、 1.22 ± 0.65 、 2.58 ± 0.54 、 3.93 ± 0.78 、 7.11 ± 1.14 、 16.89 ± 0.85 ; *IL-17* mRNA 相对表达量分别为 1.00 ± 0.36 、 4.25 ± 2.49 、 7.00 ± 2.95 、 14.75 ± 3.95 、 37.28 ± 2.51 、 50.27 ± 5.66 ; *CTGF* mRNA 相对表达量分别为 1.00 ± 0.48 、 3.87 ± 0.29 、 4.97 ± 1.20 、 11.08 ± 0.60 、 15.50 ± 2.71 、 23.64 ± 4.11 。除 15 d 染尘组大鼠肺巨噬细胞 *IL-1β* mRNA 表达量外, 各组各细胞因子的 mRNA 表达量与对照组相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 且呈线性上升趋势 ($P < 0.05$)。

[结论] 矽尘可使肺巨噬细胞 *IL-1β*、*IL-17* 及 *CTGF* mRNA 的表达上调, 且随染尘时间延长而增加, 可能是矽肺纤维化的机制之一。

关键词: 矽肺纤维化; 巨噬细胞; 白细胞介素 1β ; 白细胞介素 17; 结缔组织生长因子

Expressions of *IL-1β*, *IL-17*, and *CTGF* mRNA in pulmonary macrophages in rats with silicosis fibrosis ZHOU Qian^{1,2}, ZHANG Zhao-qiang², LIN Li^{1,2} (1. School of Public Health and Management, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261053, China; 2. Key Laboratory of Occupational Health and Environmental Medicine, Jining Medical University, Jining, Shandong 272067, China)

Abstract:

[Background] Silicosis is a systemic disease featured by diffuse fibrosis of lung tissues caused by chronic inhalation of occupational dust containing high-level free SiO_2 . This is also an occupational disease with the highest incidence and prevalence rates in China. However, the pathogenesis of silicosis is still unclear. In recent years, the cytokines related to macrophage synthesis and secretion have gained much attention owing to their significant role in the development of silicosis fibrosis. Exploring the role of cytokines related to pulmonary macrophages may be an important part to reveal the mechanism of silicosis fibrosis.

基金项目

山东省自然科学基金 (ZR2017MH085)

作者简介

周倩 (1995—), 女, 硕士生;
E-mail: 2098631178@qq.com

通信作者

林立, E-mail: linli6711@sina.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-08-01

录用日期 2019-12-24

文章编号 2095-9982(2020)02-0174-07

中图分类号 R135.2

文献标志码 A

引用

周倩, 张兆强, 林立. 大鼠矽肺纤维化进程中肺巨噬细胞 *IL-1β*、*IL-17*、*CTGF* mRNA 表达的研究 [J]. 环境与职业医学, 2020, 37(2): 174-180.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19525

Funding

This study was funded.

Correspondence to

LIN Li, E-mail: linli6711@sina.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2019-08-01

Accepted 2019-12-24

To cite

ZHOU Qian, ZHANG Zhao-qiang, LIN Li. Expressions of *IL-1β*, *IL-17*, and *CTGF* mRNA in pulmonary macrophages in rats with silicosis fibrosis [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(2): 174-180.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19525

[Objective] This experiment is conducted to investigate the expressions and changes of interleukin-1 β (*IL-1 β*), interleukin-17 (*IL-17*), and connective tissue growth factor (*CTGF*) mRNA in pulmonary macrophages in rats developing silicosis fibrosis.

[Methods] A total of 60 Wistar rats were randomly divided into six groups with 10 rats in each group: one control group and five exposure groups (15, 30, 60, 90, and 120 d exposure groups). The rats in the exposure groups were injected of 1 mL silica dust suspension (100 mg·mL⁻¹) for one time by pulmonary injection after anesthesia, and the observations lasted for 15, 30, 60, 90, and 120 d, respectively. The rats in the control group were perfused with normal saline of the same volume after anesthesia. Pulmonary macrophages were obtained by alveolar lavage after designed observation time ended. The lung tissues of each group were subject to HE and Masson staining, and determined for hydroxyproline (HYP) levels in liver tissues and expressions of *IL-1 β* , *IL-17*, and *CTGF* mRNA in pulmonary macrophages.

[Results] According to the staining results, the alveolar structure was slightly damaged and the collagen fibers were slightly increased in the 15 d exposure group; the pulmonary fibrosis was gradually obvious with the extension of silica dust exposure time; the whole lung showed diffuse fibrosis in the 120 d exposure group. Compared with the control group, the HYP levels in lung tissues were increased with the prolongation of exposure time ($P < 0.05$), and showed a rising linear trend ($P < 0.05$). The relative expression levels of *IL-1 β* mRNA in the control group and five (15, 30, 60, 90, and 120 d) exposure groups were 1.00 \pm 0.44, 1.22 \pm 0.65, 2.58 \pm 0.54, 3.93 \pm 0.78, 7.11 \pm 1.14, and 16.89 \pm 0.85, respectively; the relative expression levels of *IL-17* mRNA were 1.00 \pm 0.36, 4.25 \pm 2.49, 7.00 \pm 2.95, 14.75 \pm 3.95, 37.28 \pm 2.51, and 50.27 \pm 5.66, respectively; the relative expression levels of *CTGF* mRNA were 1.00 \pm 0.48, 3.87 \pm 0.29, 4.97 \pm 1.20, 11.08 \pm 0.60, 15.50 \pm 2.71, and 23.64 \pm 4.11, respectively. Compared with the control group, the mRNA expressions of selected cytokines in other exposure groups were significantly different ($P < 0.05$) and showed a linear rising trend ($P < 0.05$), except the *IL-1 β* mRNA expression in the 15 d exposure group.

[Conclusion] Silica dust could induce increased expressions of *IL-1 β* , *IL-17*, and *CTGF* mRNA in pulmonary macrophages with the prolongation of exposure time, which might be one of the mechanisms of silicosis fibrosis.

Keywords: silicosis fibrosis; macrophage; interleukin-1 β ; interleukin-17; connective tissue growth factor

矽肺是一种由于长期吸入游离二氧化硅 (silicon dioxide, SiO₂) 引起的职业病, 该病以慢性弥漫性肺间质纤维化增生和弥漫性炎性改变为特点^[1-2]。截至2018年底, 全国累计报告职业病97万余例, 其中90%是尘肺病, 矽肺占了尘肺病的半数以上^[3]。然而矽肺发病机制尚未完全阐明^[4]。研究表明, 白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素17 (interleukin-17, IL-17)、结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 与组织纤维化的发生密切相关, 在肝纤维化、心肌纤维化中具有重要作用^[5-9], 且在非矽尘所致肺纤维化的发展过程中也有一定作用^[10], 但这些细胞因子在矽肺纤维化中的作用报告尚少。肺巨噬细胞的损伤与功能改变在矽肺纤维化进程中起重要作用, 其合成和分泌的多种细胞因子与矽肺纤维化可能有密切关系。鉴于此, 本研究拟对一次性染尘后的大鼠进行为期120 d的观察。在此观察期内, 对不同染尘时间的大鼠肺组织进行病理学研究, 同时测定 *IL-1 β* 、*IL-17* 及 *CTGF* mRNA 在肺巨噬细胞中的表达, 动态观察各因子与矽肺纤维化的关系, 为矽肺的发病机制研究提供一定的依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

SPF级Wistar大鼠60只, 雌雄各半, 随机分为1个

对照组和5个染尘组 (一次性染尘后培养15、30、60、90、120 d), 每组10只, 体重180~220 g, 购买自济南朋悦实验动物繁育有限公司, 生产许可证号: SCXK (鲁) 20140007。所有大鼠均饲养在济宁医学院实验动物中心 (实验许可号: SYXK (鲁) -20180002), 常规饮食, 统一管理。本实验通过动物伦理学审查, 伦理编号为2017-GW-001。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 Arktik5020多功能PCR仪 (美国Thermo公司), 实时荧光定量PCR仪 (美国Bio-Rad公司), Q5000超微量紫外分光光度计 (美国Quawell公司), 台式高速冷冻离心机 (中国上海卢湘仪离心机仪器有限公司), Leica Autostainer XL全自动染色机、莱卡CV5030全自动封片机 (德国莱卡公司), 病理图文分析成像系统 (中国北京天健公司)。

1.2.2 主要试剂 矽尘 (中国天津市北联精细化学品开发有限公司), Trizol RNA提取试剂、M-MuLV第一链cDNA合成试剂盒、2 \times SG Fast qPCR Master Mix试剂、引物及内参的设计及合成 (中国上海生工生物工程有限责任公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠处理 取1 g矽尘溶于10 mL水中, 配成100 mg·mL⁻¹矽尘悬浊液。在麻醉瓶中加入适量乙醚, 将大鼠放入瓶中, 待大鼠麻醉后取出, 立刻用注射器吸

取1 mL 矽尘悬浊液,通过气管插管注入大鼠肺中。对照组灌注1 mL 生理盐水,120 d后处死。

1.3.2 肺组织巨噬细胞获取 将2 mL 生理盐水用注射器从气管注入大鼠肺内,缓慢回抽获取支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF),如此反复抽注,用双层灭菌纱布过滤BALF中的黏液,重复5次。离心半径为13.5 cm, 1500 r·min⁻¹离心10 min,收集沉淀,用无血清的培养液反复洗涤沉淀3次,加入RPMI-1640,在饱和湿度条件下贴壁2 h,弃去未贴壁的细胞,贴壁的细胞即为肺巨噬细胞^[11]。

1.3.3 肺组织病理学检查 首先进行大体病理观察。之后切取左肺组织0.3 mm³,固定于4%多聚甲醛中,行HE染色和Masson染色,并分别在10倍和40倍显微镜下观察。

1.3.4 肺组织羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)含量测定 按试剂盒说明书的操作步骤通过酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)进行HYP含量测定。用纯化的大鼠HYP抗体包被微孔板,向微孔中依次加入HYP,再与辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的HYP抗体结合,彻底洗涤后加底物3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺(3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine, TMB)显色。TMB在辣根过氧化物酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成黄色。颜色的深浅和样品中的HYP量呈正相关关系。用酶标仪在450 nm波长下测定吸光度(D),通过标准曲线计算样品中大鼠肺组织HYP含量。

1.3.5 肺组织巨噬细胞IL-1β、IL-17、CTGF mRNA表达量测定 (1)肺组织巨噬细胞总RNA提取。用Trizol法提取大鼠肺组织巨噬细胞RNA,根据试剂盒说明对获取的巨噬细胞进行操作,同时用微量紫外分光光度计测量总RNA浓度和纯度。总RNA浓度>4 μg·mL⁻¹为符合标准;D_{260/280}范围在1.8~2.0之间视为RNA纯度符合标准。(2)逆转录反应。使用M-MuLV第一链cDNA合成试剂盒,按说明书逆转录为cDNA。逆转录步骤:首先在42℃反应50 min,利用RNA为模板进行逆转录合成cDNA,然后70℃反应10 min终止反应。逆转录之后,将cDNA于4℃保存备用。(3)RT-qPCR反应。按试剂盒说明书,利用逆转录得到的cDNA进行RT-qPCR反应。基因引物序列见表1。

每个样品设置1个孔,参照公式(1),以β-actin为内参,用2^{-ΔΔCt}法计算各样品的mRNA相对表达量。以对照组的平均mRNA表达量为基准,计算其他各组

相对表达量。

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_1 - \Delta Ct_2 = \Delta (Ct_{目的} - Ct_{空白}) - \Delta (Ct_{内参} - Ct_{空白}) = \Delta Ct_{目的} - \Delta Ct_{内参} \quad \text{公式(1)}$$

表1 各基因引物序列

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
IL-1β	CTCACAGCAGCATCTCGACAAGAG	CACACTAGCAGGTCGTCATCC
IL-17	TGCTGATGCTGTTGCTGCTAC	GGTGAAGTGAACGGTTGAGGTAG
CTGF	CACCGCACAGAACCACCACAC	GGCAGGCACAGGCTTTGATGAAC
β-actin	ATGGAAGACGAAATTGCCG	TTAGAAGCATTTCAGGTGGACGA

1.4 统计学分析

实验所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 21.0进行数据分析。应用单因素方差分析方法分析组间差异。采用LSD法分析各染尘组与对照组的差异,采用方差线性趋势检验分析其趋势。检验水准α=0.05。

2 结果

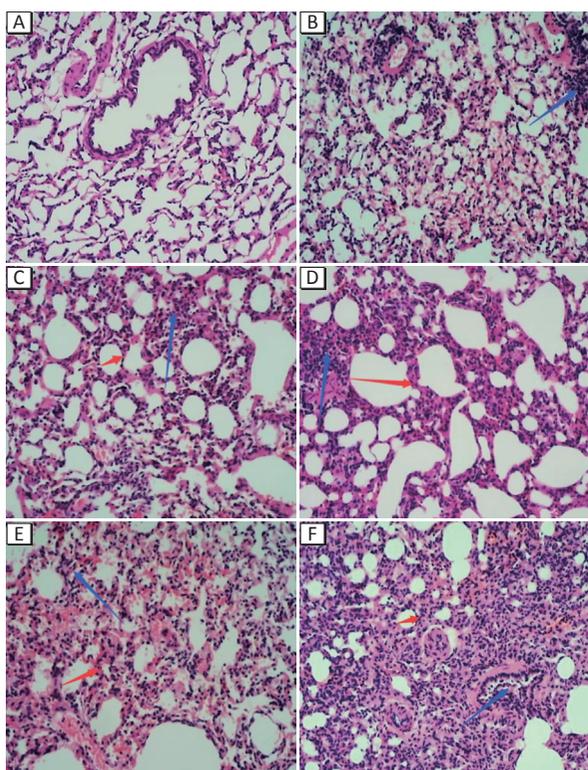
2.1 大鼠一般情况

对照组大鼠未见异常情况;15 d染尘组大鼠毛色光泽度略有下降;30 d染尘组大鼠脱毛现象略有加剧,毛色偏暗;60 d染尘组大鼠脱毛更严重,精神不振;90 d染尘组大鼠脱毛现象更加严重,食欲不振,精神萎靡;120 d染尘组大鼠脱毛现象十分严重,毛色无光泽,行动迟缓。

2.2 肺组织的病理改变

2.2.1 肺组织大体病理改变 对照组大鼠肺组织表面色泽红润,触之质软,有弹性;15 d染尘组大鼠肺组织表面略有发暗,触之质软,弹性略有下降;30 d染尘组大鼠肺组织表面有少量散在砂粒状结节,并伴有少量点状出血,触之质硬,弹性略有下降;60 d染尘组大鼠肺组织表面色泽灰白,有明显点状的突出,触之质硬,弹性下降;90 d染尘组大鼠肺组织表面淤血点较多,有的可见粟粒大结节,触之质硬,弹性差;120 d染尘组大鼠肺组织表面有多处淤血点,可见粟粒大结节,触之硬度增加,无弹性。

2.2.2 肺组织HE染色病理结果 对照组大鼠肺组织形态正常,肺泡清晰;15 d染尘组大鼠肺泡巨噬细胞增多,其他情况未见异常;30 d染尘组大鼠肺泡开始出现炎性改变,肺泡结构略有破坏;60 d染尘组大鼠肺泡结构破坏程度加重,肺泡壁增厚;90 d染尘组大鼠出现大量巨噬细胞进入肺泡,肺泡结构严重破坏;120 d染尘组大鼠肺泡内充满巨噬细胞,肺泡壁模糊,肺泡几乎消失。见图1。



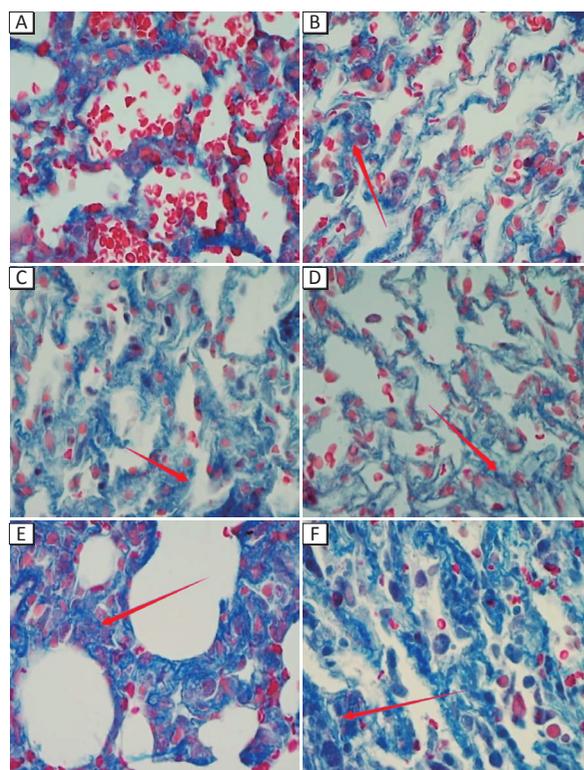
[注] A：对照组（形态正常，肺泡清晰）；B：15 d 染尘组（巨噬细胞增多）；C：30 d 染尘组（肺泡结构略有破坏）；D：60 d 染尘组（肺泡结构破坏程度加重）；E：90 d 染尘组（肺泡结构严重破坏）；F：120 d 染尘组（肺泡壁模糊，肺泡几乎消失）。红色箭头为肺泡结构破坏，肺泡壁增厚；蓝色箭头为巨噬细胞增多。

图1 大鼠肺组织 HE 染色病理结果 (×10)

2.2.3 肺组织 Masson 染色病理结果 对照组肺泡结构正常，未出现炎症或纤维化表现；15 d 染尘组大鼠肺泡结构略有紊乱，肺泡间隔稍微增宽，胶原纤维沉积略有增多；30 d 染尘组大鼠肺泡结构紊乱加重，肺泡间隔增宽变大，胶原纤维沉积继续增多；60 d 染尘组大鼠肺泡结构紊乱更加严重，肺泡间隔明显增宽，胶原纤维沉积明显增多，胶原纤维含量进一步增多；90 d 染尘组大鼠肺泡结构紊乱很严重，胶原纤维沉积很多，纤维化加重明显；120 d 染尘组大鼠大量肺泡结构破坏，部分肺泡塌陷融合，肺泡间隔增厚，出现大量宽带状及片状胶原纤维，呈弥漫纤维化改变。见图 2。

2.3 肺组织 HYP 含量

对照组以及 15、30、60、90、120 d 染尘组大鼠肺组织 HYP 含量分别为 (30.47±3.82)、(33.60±2.05)、(34.08±3.49)、(39.26±4.41)、(62.84±18.96)、(98.95±7.76) mg·g⁻¹。染尘组大鼠肺组织 HYP 含量随着染尘时间延长而增加，与对照组相比差异有统计学意义 (P<0.05)，且呈线性上升趋势 (P<0.05)。



[注] A：对照组（未出现炎症或纤维化表现）；B：15 d 染尘组（胶原纤维沉积略有增多）；C：30 d 染尘组（胶原纤维沉积继续增多）；D：60 d 染尘组（胶原纤维沉积明显增多）；E：90 d 染尘组（胶原纤维沉积很多）；F：120 d 染尘组（大量宽带状及片状胶原纤维，呈弥漫纤维化改变）。红色箭头为胶原纤维增多，胶原纤维呈蓝绿色，肌原纤维呈红色。

图2 大鼠肺组织 Masson 染色病理结果 (×40)

2.4 肺组织巨噬细胞 IL-1β、IL-17、CTGF mRNA 的表达

肺组织巨噬细胞 IL-1β、IL-17、CTGF mRNA 的表达量在各组间差异均有统计学意义 (P<0.05)。与对照组相比，除 15 d 染尘组大鼠肺组织巨噬细胞的 IL-1β mRNA 外，各组各细胞因子 mRNA 表达量均增高 (P<0.05)，且呈线性上升趋势 (P<0.05)。见表 2。

表 2 大鼠肺组织巨噬细胞 IL-1β、IL-17、CTGF mRNA 的表达 (x̄±s, n=10)

分组	IL-1β	IL-17	CTGF
对照组	1.00±0.44	1.00±0.36	1.00±0.48
15 d 染尘组	1.22±0.65	4.25±2.49*	3.87±0.29*
30 d 染尘组	2.58±0.54*	7.00±2.95*	4.97±1.20*
60 d 染尘组	3.93±0.78*	14.75±3.95*	11.08±0.60*
90 d 染尘组	7.11±1.14*	37.28±2.51*	15.50±2.71*
120 d 染尘组	16.89±0.85*	50.27±5.66*	23.64±4.11*
F	452.606	296.837	108.079
P	<0.001	<0.001	<0.001
F ₁	1677.002	1337.513	495.715
P ₁	<0.001	<0.001	<0.001

[注] *：与对照组相比，P<0.05；F₁、P₁ 为方差趋势检验结果。

3 讨论

本研究结果表明,大鼠一次性染尘后,经过不同的时间,肺组织逐渐出现纤维化改变。15 d染尘组大鼠肺泡结构略有紊乱,胶原纤维略有增多,但未出现明显的纤维化改变。在120 d染尘组大鼠整个肺组织出现大量宽带状及片状胶原纤维,呈弥漫纤维化改变,出现残片状肺组织并且导致肺泡结构的破坏。与该病理变化对应,各染尘组肺组织HYP含量也出现一致性的变化,即随着染尘时间的延长,HYP含量升高。HYP是胶原蛋白标志性成分,肺泡间质出现胶原纤维可作为肺纤维化的标志^[12]。由此可表明,在该实验条件下(一次性肺内注入1 mL 100 mg·mL⁻¹的矽尘)即可导致大鼠肺组织明显纤维化改变。

本研究结果还显示,*IL-1β*、*IL-17*及*CTGF* mRNA的表达也出现随着染尘时间延长而逐渐增高的趋势,并与纤维化病理改变及肺组织HYP含量的改变具有一致性,表明*IL-1β*、*IL-17*及*CTGF*在矽肺纤维化进程中可能有促进作用。本研究中15 d染尘组大鼠肺组织巨噬细胞的*IL-1β* mRNA表达量是对照组的1.22倍,mRNA表达量增加较缓慢,随后呈线性增加趋势,在120 d时为对照组的16.89倍。*IL-1β*是一种炎性细胞因子,受到矽尘刺激后,巨噬细胞分泌*IL-1β*,可导致I型纤维细胞增多,并通过抑制胶原酶来引起细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中的胶原堆积,使胶原无法降解,引起胶原纤维增生^[13-14],从而可能产生纤维化。高表达的*IL-1β* mRNA可激活核转录因子(nuclear factor-kappa B, NF-κB),后者可与致纤维因子——转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)的启动子结合,诱导致纤维因子的表达,介导成纤维细胞转化为纤维细胞^[15]。*IL-1β* mRNA表达的上调也可以激活Akt/NF-κB信号转导通路,促进II型纤维细胞凋亡^[16],降低肺泡表面活性物质的生成量,从而使肺组织修复能力减弱,加重肺纤维化的进程。

*IL-17*主要是由T细胞产生的一种前炎症细胞因子,具有抗感染、自身免疫调节的功能,而巨噬细胞亦可分泌*IL-17*,在某些因素的作用下,巨噬细胞可高表达*IL-17*^[17-18]。本研究中15 d染尘组大鼠肺组织巨噬细胞的*IL-17* mRNA表达量是对照组的4.25倍,随染毒时间延长,*IL-17* mRNA表达量增加,呈线性增加趋势,比*IL-1β* mRNA表达量增加更加明显,在90 d时染尘组已经达到对照组的37.28倍,在120 d时染尘组为对照组的50.27倍。该因子与肺纤维化的关系可能与

下列因素有关。①可诱导肺泡上皮细胞发生上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),通过EMT途径可诱导V型胶原过度表达,使上皮细胞转化为活化的肌成纤维细胞和成纤维细胞,而肌成纤维细胞可促进胶原蛋白的合成与纤维化的发展^[19]。②*IL-17*高表达可产生肌成纤维细胞标志性蛋白——α-平滑肌肌动蛋白,造成平滑肌收缩,促进细胞内I型胶原合成,产生纤维化^[20]。③*IL-17* mRNA上调还可以干预TGF-β/Smads信号通路,促使TGF-β从细胞质进入细胞核内进行表达,促进胶原蛋白和结缔组织增生,使正常肺组织被结缔组织替代并产生纤维化^[21]。④*IL-17*可诱导肿瘤坏死因子-α^[22],引起炎症加剧并加快间质细胞的分化速度,从而导致ECM中的胶原增生并抑制其分解,并可通过细胞外信号调节激酶通路产生致纤维因子TGF-β1^[23]。但矽尘致巨噬细胞高表达*IL-17*的机制还需进一步研究。

*CTGF*是一种促成纤维细胞分裂和促进胶原沉积的生长因子,其过度表达与某些纤维化疾病或增生的发生发展密切相关^[24]。本研究中*CTGF* mRNA相对表达量一开始增加较快,15 d染尘组是对照组的3.87倍,也具有线性增长趋势,比*IL-1β* mRNA的表达增加更加明显,120 d染尘组为对照组的23.64倍。*CTGF*的高表达,一方面可促进成纤维细胞大量增生及ECM的合成^[25],另一方面,*CTGF*是TGF-β1的主要下游效应因子,而TGF-β1是纤维化过程中的枢纽因子与关键因素,能促进肺纤维化的形成与发展^[26]。*CTGF*与TGF-β1之间还具有协同的关系,通过激活TGF-β1/*CTGF*信号通路,共同促进纤维化的发展^[27-28]。

总之,本研究发现*IL-1β*、*IL-17*、*CTGF* mRNA表达水平均随着染尘时间延长而增加,表明*IL-1β*、*IL-17*、*CTGF*在矽肺纤维化过程中有重要作用,这些肺巨噬细胞分泌的细胞因子表达量异常增多可能是矽肺纤维化的重要促进因素。本研究最长染尘时间是120 d,这与作业工人一般要经过5~10年以上的矽尘暴露才能致病不同。此外,通过剪切修饰,*IL-1β* mRNA表达量和蛋白表达量之间的相关性弱于*IL-17*、*CTGF* mRNA与蛋白表达量的相关性^[29-31],因此,直接测定*IL-1β*蛋白可能更能反映该因子与纤维化的关系。

参考文献

- [1] ASENJO MM, GUERRA J MM, PÉREZ CI, et al. Silicosis and Sjögren's syndrome [J]. Arch Bronconeumol, 2019, 55

- (10) : 536-537.
- [2] RILEY L, URBINE D. Chronic silicosis with progressive massive fibrosis [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380 (23) : 2256.
- [3] 李德鸿. 不要把尘肺病防治引入歧途 [J]. *环境与职业医学*, 2018, 35 (4) : 283-285.
- [4] The Lancet Respiratory Medicine. The world is failing on silicosis [J]. *Lancet Respir Med*, 2019, 7 (4) : 283.
- [5] STANKE F, HECTOR A, HEDTFELD S, et al. An informative intragenic microsatellite marker suggests the IL-1 receptor as a genetic modifier in cystic fibrosis [J]. *Eur Respir J*, 2017, 50 (6) : 1700426.
- [6] KRAFT L, ERDENESUKH T, SAUTER M, et al. Blocking the IL-1 β signalling pathway prevents chronic viral myocarditis and cardiac remodeling [J]. *Basic Res Cardiol*, 2019, 114 (2) : 11.
- [7] AHMED S, MISRA DP, AGARWAL V. Interleukin-17 pathways in systemic sclerosis-associated fibrosis [J]. *Rheumatol Int*, 2019, 39 (7) : 1135-1143.
- [8] ZEPEDA-MORALES AS, DEL TORO-ARREOLA S, GARCÍA-BENAVIDES L, et al. Liver fibrosis in bile duct-ligated rats correlates with increased hepatic IL-17 and TGF- β 2 expression [J]. *Ann Hepatol*, 2016, 15 (3) : 418-426.
- [9] HAN K, ZHANG Y, YANG Z. Cilostazol protects rats against alcohol-induced hepatic fibrosis via suppression of TGF- β 1/CTGF activation and the cAMP/Epac1 pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17 (3) : 2381-2388.
- [10] KIM MS, KIM SH, JEON D, et al. Changes in expression of cytokines in polyhexamethylene guanidine-induced lung fibrosis in mice : comparison of bleomycin-induced lung fibrosis [J]. *Toxicology*, 2018, 393 : 185-192.
- [11] ZHANG ZQ, ZHANG CZ, SHAO B, et al. Effects of abnormal expression of fusion and fission genes on the morphology and function of lung macrophage mitochondria in SiO₂-induced silicosis fibrosis in rats *in vivo* [J]. *Toxicol Lett*, 2019, 312 : 182-187.
- [12] MONTGOMERY NT, ZIENTEK KD, POKIDYSHEVA EN, et al. Post-translational modification of type IV collagen with 3-hydroxyproline affects its interactions with glycoprotein VI and nidogens 1 and 2 [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293 (16) : 5987-5999.
- [13] LI J, XUE J, WANG D, et al. Regulation of gasdermin D by miR-379-5p is involved in arsenite-induced activation of hepatic stellate cells and in fibrosis via secretion of IL-1 β from human hepatic cells [J]. *Metallomics*, 2019, 11 (2) : 483-495.
- [14] SUGIOKA K, YOSHIDA K, MURAKAMI J, et al. Inhibition by Epigallocatechin Gallate of IL-1-induced Urokinase-type plasminogen activator expression and collagen degradation by corneal fibroblasts [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60 (8) : 2895-2903.
- [15] MA J, LIU C, YANG Y, et al. C/EBP β Acts upstream of NF- κ B P65 subunit in Ox-LDL-induced IL-1 β production by macrophages [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48 (4) : 1605-1625.
- [16] NIE Y, YU K, LI B, et al. S-allyl- L -cysteine attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and inflammation via AKT/NF- κ B signaling pathway in mice [J]. *J Pharmacol Sci*, 2019, 139 (4) : 377-384.
- [17] 施翔翔. 巨噬细胞 CCL20 和 IL-17 的调控机制及其与冠心病的关系研究 [D]. 广州 : 南方医科大学, 2018.
- [18] ISHIDA H, IMAI T, SUZUE K, et al. IL-23 protection against *Plasmodium berghei* infection in mice is partially dependent on IL-17 from macrophages [J]. *Eur J Immunol*, 2013, 43 (10) : 2696-2706.
- [19] HUANG Q, HAN J, FAN J, et al. IL-17 induces EMT via Stat3 in lung adenocarcinoma [J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6 (2) : 440-51.
- [20] LU JR, HAN HY, HU J, et al. Mechanism research of Bu-Shen-Huo-Xue formula against renal fibrosis in rats with 5/6 nephrectomy via E-cadherin, α -SMA, and TGF- β 1 [J]. *Clin Nephrol*, 2018, 90 (1) : 53-58.
- [21] YANG HY, KIM KS, LEE YH, et al. *Dendropanax morbifera* ameliorates thioacetamide-induced hepatic fibrosis via TGF- β 1/Smads pathways [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15 (4) : 800-811.
- [22] ISRAËL L, BARDET M, HUPPERTZ A, et al. A CARD10-dependent tonic signalosome activates MALT1 paracaspase and regulates IL-17/TNF- α -driven keratinocyte inflammation [J]. *J Invest Dermatol*, 2018, 138 (9) : 2075-2079.
- [23] KRITHIKA R, JYOTHILAKSHMI V, VERMA RJ. Phyllanthin inhibits CCl₄-mediated oxidative stress and hepatic fibrosis by down-regulating TNF- α /NF- κ B, and pro-fibrotic factor TGF- β 1 mediating inflammatory signaling [J]. *Toxicol Ind Health*, 2016, 32 (5) : 953-960.
- [24] DORN LE, PETROSINO JM, WRIGHT P, et al. CTGF/CCN2

- is an autocrine regulator of cardiac fibrosis [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 121 : 205-211.
- [25] RIQUELME-GUZMÁN C, CONTRERAS O, BRANDAN E. Expression of CTGF/CCN2 in response to LPA is stimulated by fibrotic extracellular matrix via the integrin/FAK axis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 314 (4) : C415-C427.
- [26] NIE Y, ZHANG D, QIAN F, et al. Baccatin III ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via suppression of TGF- β 1 production and TGF- β 1-induced fibroblast differentiation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 74 : 105696.
- [27] NAKAI K, KARITA S, IGARASHI J, et al. COA-Cl prevented TGF- β 1-induced CTGF expression by Akt dephosphorylation in normal human dermal fibroblasts, and it attenuated skin fibrosis in mice models of systemic sclerosis [J]. *J Dermatol Sci*, 2019, 94 (1) : 205-212.
- [28] SLAWIK J, ADRIAN L, HOHL M, et al. Irregular pacing of ventricular cardiomyocytes induces pro-fibrotic signalling involving paracrine effects of transforming growth factor beta and connective tissue growth factor [J]. *Eur J Heart Fail*, 2019, 21 (4) : 482-491.
- [29] 张跃军, 蒋传好, 肖鹏程, 等. 梅毒螺旋体膜蛋白 Tp0971 激活 MAPKs 和 NF- κ B 诱导巨噬细胞分泌 TNF- α 和 IL-1 β [J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35 (5) : 545-548.
- [30] MOTAMEDZADEH L, MOHAMMADI MM, HADINEDOUSHAN H, et al. Association of IL-17 and IL-23 follicular fluid concentrations and gene expression profile in cumulus cells from infertile women at risk for ovarian hyperstimulation syndrome [J]. *Hum Fertil*, 2019 : 1-7.
- [31] KUNZMANN S, KREMPL C, SEIDENSPINNER S, et al. Increase in CTGF mRNA expression by respiratory syncytial virus infection is abrogated by caffeine in lung epithelial cells [J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2018, 12 (5) : 662-666.
- (英文编辑: 汪源; 编辑: 韩凤婵、汪源; 校对: 陈姣)

(上接第 167 页)

- young Japanese male subjects [J]. *Public Health*, 2011, 125 (2) : 93-100.
- [11] YU C P, LIN C M, TSAI M J, et al. Effects of short forest bathing program on autonomic nervous system activity and mood states in middle-aged and elderly individuals [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2017, 14 (8) : 897.
- [12] MAO G X, CAO Y B, LAN X G, et al. Therapeutic effect of forest bathing on human hypertension in the elderly [J]. *J Cardiol*, 2012, 60 (6) : 495-502.
- [13] LEE J Y, LEE D C. Cardiac and pulmonary benefits of forest walking versus city walking in elderly women : a randomised, controlled, open-label trial [J]. *Eur J Integr Med*, 2014, 6 (1) : 5-11.
- [14] JIA B B, YANG Z X, MAO G X, et al. Health effect of forest bathing trip on elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Biomed Environ Sci*, 2016, 29 (3) : 212-218.
- [15] MAO G X, LAN X G, CAO Y B, et al. Effects of short-term forest bathing on human health in a broad-leaved evergreen forest in Zhejiang Province, China [J]. *Biomed Environ Sci*, 2012, 25 (3) : 317-324.
- (英文编辑: 汪源; 编辑: 韩凤婵, 汪源; 校对: 汪源)